

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR *Theileria equi***  
**EM EQUINOS DO ESTADO DA PARAÍBA**

**Luana Paula da Silva Ribeiro**  
**Médica veterinária**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR *Theileria equi***  
**EM EQUINOS DO ESTADO DA PARAÍBA**

**Luana Paula da Silva Ribeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira**

**Co-orientador: Danilo Stipp**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

LUANA PAULA DA SILVA RIBEIRO

**DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Theileria*  
*equi* EM EQUINOS DO ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal do Centro de Ciências  
Agrárias da Universidade Federal da  
Paraíba, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal. Área de  
Concentração Saúde Animal do brejo  
paraibano.

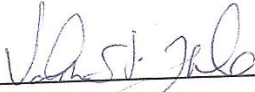
APROVADA EM 16/12/2015

BANCA EXAMINADORA



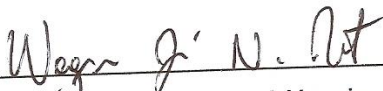
---

Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp  
DCV/CCA/UFPB  
Orientador



---

Profa. Dra. Valeska Shelda Pessoa de Melo  
DCV/CCA/UFPB  
Examinador



---

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto  
UFAL  
Examinador

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

LUANA PAULA DA SILVA RIBEIRO – Nascida em Nova Iguaçu-RJ, em 25 de março de 1988. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba (2014). Desenvolveu trabalhos de Iniciação Científica e Extensão.

## EPÍGRAFE

Os homens são animais muito estranhos:  
uma mistura do nervosismo  
de um cavalo, da teimosia de uma  
mula e da malícia de um camelo.

Aldous Huxley

## **DEDICATÓRIA**

Aos que estiveram comigo em todos os meus caminhos e que mesmo longe me incentivaram, vibraram e acreditaram em mim.

A todos que participaram do meu processo de aprendizagem, tanto pessoal, quanto profissional.

A todos aqueles que fizeram em momentos tristes, vibrar um belo sorriso, mesmo em meio a tantas tempestades.

A todos que duvidaram da minha capacidade.

A todos que sabiam que eu conseguiria.

E por fim, a minha amada mãe, Neta.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, Maria Luzinete (Neta), a qual me conferiu a vida, e me transformou na pessoa que sou hoje, me dando uma educação exemplar, ensinando-me a sempre me importar com o próximo, nunca passar por cima de ninguém e sempre esperar a minha vez, além de sempre fazer das minhas lágrimas e agonias, um momento de descontração, fazendo-me sorrir novamente.

A minha amiga, Edlaine Pinheiro, que sempre juntas lutamos, rimos e choramos nas mais diversas situações. Além disso, o desenvolver deste estudo, jamais teria sido possível sem sua generosidade e dedicação. Assim, como também, ao Walter Pequeno, o qual nunca mediu esforços para me auxiliar no que fosse necessário.

A minha amiga, Michele Flávia, que nunca hesitou em me ouvir e me ajudar, as vezes compartilhando as mesmas agonias e as vezes os mesmos risos soltos e sinceros. Sem você, amiga, teria sido complicado as aulas do mestrado e tudo que isso implicou. Obrigada, por sempre acalmar essa mente confusa.

A Laysa Cordeiro e Beatriz Bráz, juntas compartilhamos horas no laboratório e madrugadas viajando.

Ao meu orientador, Rafael Viera, o qual me conferiu a oportunidade de ter um grande aprendizado, tanto na vida profissional quanto pessoal. Ao meu co-orientador Danilo Stipp, que desempenhou um papel fundamental para que esse trabalho chegasse ao fim, sempre entendendo os por menores e estimulando de maneira positiva, ao senhor o meu muitíssimo obrigado.

E todos aqueles que não citei, mais que de forma indireta ou direta, fizeram parte do meu crescimento e desempenho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
Capítulo I.....	i
RESUMO GERAL.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
CAPÍTULO I – SEROLOGICAL AND MOLECULAR DETECTION OF <i>Theileria equi</i> IN SPORT HORSES FROM AN ENDEMIC TROPICAL AREA OF BRAZIL.....	5
Abstract.....	5
Introduction.....	6
Materials and methods.....	7
Results.....	11
Discussion.....	13
Conclusion.....	14
References.....	15
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS.....	26



# DETECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR *Theileria equi* EM EQUINOS DO ESTADO DA PARAÍBA

**RESUMO GERAL-** A Piroplasmose equina é uma doença infecciosa, transmitida por carrapatos, tendo como agente etiológico *Theileria equi*, parasita eritrocitário obrigatório. Desta forma, objetivo do estudo foi avaliar a soroprevalência e dados moleculares da *T. equi* em equinos de áreas urbana e rural em seis municípios do Estado da Paraíba no nordeste do Brasil. Foram coletadas amostras de sangue de 119 animais, determinando os valores de proteína total, volume globular e realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). De todos os animais estudados, 61, 6% (85/119) foram soropositivos na RIFI e 49, 6% (59/119) foram positivas na PCR. Na avaliação dos questionários epidemiológicos para análise dos fatores de riscos, não foi encontrada associação significativa entre a presença de carrapatos, idade ou sexo com a soropositividade ou detecção molecular para *T. equi* ( $p > 0,05$ ). A prevalência na análise sorológica e molecular, e hematócrito menor que 32% foi de 68,9% e 64,4%, respectivamente. Os equinos que tiveram a proteína plasmática total aumentada ( $> 7,9$  g/dL) foi de 66, 38% na sorologia e 52,33% na análise molecular. Assim, percebe-se à necessidade de controle dos carrapatos, monitoramento do estado de saúde dos animais e elaboração de programas de vigilância ativa para evitar a propagação deste protozoário a animais suscetíveis.

**Palavras-chave:** piroplasmose; sorologia; PCR

## **DETECTION SEROLOGICAL AND MOLECULAR OF *Theileria equi* IN HORSES OF PARAIBA STATE, NORTHEASTERN BRAZIL**

**ABSTRACT** – Equine piroplasmosis is a tick borne infectious disease, whose etiologic agent *Theileria equi* is an obligatory erythrocyte parasite. Thus, the aim of this study was to evaluate the prevalence and molecular data of *T. equi* in horses from urban and rural areas in six cities of Paraíba state, in northeastern Brazil. Blood samples from 119 animals were collected in order to evaluate total protein values, globular volume and also performing indirect immunofluorescence assay (IFA) and polymerase chain reaction (PCR). Of all the animals studied, 61, 6% (85/119) were seropositive at IFAT and 49, 6% (59/119) were positive in PCR. In the evaluation of epidemiological surveys for analysis of risk factors, there was no significant association between the presence of ticks, age or sex with seropositivity or molecular detection of *T. equi* ( $p > 0.05$ ). The prevalence of the infection in serological and molecular analysis when compared with hematocrit values less than 32% was 68.9% and 64.4%, respectively. The horses that had increased total plasma protein ( $> 7.9$  g / dL) was 66, 38% in serology and 52,33% molecular analysis. Thus, it is need to control ticks, monitoring the health status of animals and preparation of active surveillance programs to prevent the spread of this parasite to susceptible animals.

**Keywords:** piroplasmosis; serology; PCR

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. O AGENTE E A TRANSMISSÃO

Dentre as enfermidades que afetam os equinos, as doenças parasitárias têm grande importância, principalmente as hemoparasitoses, que causam danos à sanidade animal, levando a um comprometimento do desempenho dos equinos. A parasitose de maior relevância em termos econômicos na equinocultura, é a theileriose, que causam prejuízos diretos, desde a queda na performance até a morte de animais, e indiretos, devido à restrição de comercialização e trânsito de equinos soropositivos (FRIEDOFF, 1990).

A theileriose equina é uma infecção intra-eritrocitária amplamente disseminada entre os animais e desde a descoberta do gênero no final do século 19, várias espécies têm sido descritas em animais domésticos e silvestres, com diversas espécies de carrapatos atuando como vetores. É causada por um protozoário, denominado *Theileria equi* (CHAUVIN et al., 2009). Estes parasitas são transmitidos principalmente pela picada de carrapatos, podendo também ser transmitidos através do sangue infectado e infecções intrauterinas, infectando assim os hospedeiros (DE WALL E VAN HEERDEN, 2004). No Brasil, os carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Amblyomma cajenense* e *Dermacentor (Anocentor) nitens* são os principais vetores de transmissão de *T. equi* (ROTHSCHILD; DONALD, 2007).

### 2. PATOGENIA E ALTERAÇÕES CLÍNICAS

A patogenia da enfermidade está relacionada com multiplicação do parasita nos eritrócitos, resultando em duas ou quatro células filhas, que deixam a hemácia parasitada e invadem outra hemácia. Dessa maneira, quando a *T. equi* invadem os eritrócitos o sistema mononuclear fagocitário age na remoção destas células

parasitadas ocorrendo assim anemia hemolítica, devido a ruptura dos eritrócitos. (HENRY, 1993). As alterações clínicas mais comumente observadas são picos febris intermitentes, anemia devido à hemólise, depressão, anorexia em animais altamente parasitados, membranas ictéricas, petéquias nas mucosas equimoses, edema de extremidades e abdômen ventral, desconforto abdominal causado pelo depósito de bilirrubina nas serosas do trato gastrointestinal (THOMASSIAN, 2005), hemoglobinemia, hemoglobinúria (FELDMAN, 2000). Além disso, a enfermidade causa significativa redução no desempenho, aborto, diminuição da fertilidade dos animais afetados e consequentemente, custos elevados com tratamentos e manejos especiais (MADRUGA et al., 2001). Os índices de mortalidade podem variar de 5% a 10% e taxas superiores a 50% são observadas em equinos adultos não expostos previamente ao agente (ROTHSCHILD; DONALD, 2007).

### **3. EPIDEMIOLOGIA**

É uma enfermidade que possui distribuição mundial, sendo endêmica na maioria das áreas tropicais e subtropicais, além de algumas regiões temperadas (DE WAAL, 1992), estando esta distribuição estreitamente relacionada com as zonas de maior concentração de carrapatos (FRIEDHOFF, 1988). A prevalência da theileriose vem sendo investigada em vários países, e os resultados variam de acordo com os fatores epidemiológicos regionais (CUNHA et al., 1998). Embora nos países como os Estados Unidos (EUA), Austrália, Inglaterra e Canadá, este parasita seja menos prevalente, mesmo com os regulamentos de trânsito, ainda há um potencial para a disseminação de equinos infectados ou carrapatos de regiões endêmicas (ROTHSCHILD; DONALD, 2007).

No Brasil, é considerada uma doença endêmica e a identificação dos fatores de riscos associados com essa infecção desempenha um papel fundamental na adoção de medidas de controle (SANTOS et al., 2011). Estudos relatam alguns dos fatores de risco que podem estar associados com tal enfermidade, como a idade,

presença de carrapatos, atividade atlética/esportiva, área geográfica, estação do ano, entre outros (KOUAM et al., 2010; GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2013).

Alguns estudos sobre a soroprevalência de *T. equi* foram realizados em diversos países, na Europa, as taxas mais baixas foram 7,3% na Suíça (SIGG et al., 2010) e 4% na Holanda (BUTLER et al., 2012), já em Portugal e na Grécia, a soroprevalência variou entre 11% a 17,9% (KOUAM et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013). No Brasil, foram encontradas soroprevalências de 78,3% e 61% nas regiões sul e centro-oeste do estado do Paraná, respectivamente (VIEIRA et al., 2013; PROCHNO et al., 2014). Em microrregiões do estado do Rio de Janeiro, a soroprevalência de *T. equi* foi de 81,09% (SANTOS et al., 2011).

#### **4. DIAGNÓSTICO**

Análises laboratoriais de rotina podem ajudar a confirmar os achados clínicos, independentemente da síndrome clínica, a maioria dos hospedeiros, apresentam algum grau de anemia, caracterizando-se pela diminuição do volume globular, hemoglobina e contagem de eritrócitos (WISE et al., 2014).

Identificação de *T. equi* em animais crônicos em exame de esfregaços de sangue é muito difícil, como também impreciso e, portanto, são realizados métodos sorológicos. Organização Mundial de Saúde Animal, aprovou a realização de testes sorológicos para realização do diagnóstico, dentre os testes preconizados, estão a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (OIE, 2014). O ELISA competitivo (cELISA), outro ensaio aprovado pela OIE para o trânsito internacional de equinos, é considerado o teste mais sensível para a infecção crônica ou inaparente de *T. equi*, pois detecta as respostas de anticorpos para EMA-1 e 2, além de ser validado para a detecção de anticorpos contra vários isolados de *T. equi* encontrados globalmente (WISE et al., 2014). No entanto, esses testes sorológicos podem determinar reações falso-negativas ou falso-positivas (TENTER; FREIDHOFF, 1986).

Em *T. equi*, a proteína *equi merozoite antigen-1* (EMA-1) é um antígeno expresso na superfície do merozoíto, sendo predominantemente reconhecido por anticorpos de equinos infectados por *T. equi* (KNOWLES et al., 1997). Equídeos infectados com *T. equi* desenvolvem altos títulos de anticorpos contra proteínas de superfície de merozoítos, sugerindo que estão envolvidos no controle da multiplicação e eliminação do parasito (CUNHA et al. 2006). Essas proteínas são importantes na patogênese de doenças hemoparasitárias devido a seu papel no reconhecimento do parasita e penetração nos eritrócitos do hospedeiro (JACK e WARD, 1981; KUMAR et al, 2004).

Atualmente, com a introdução da biologia molecular na detecção e caracterização de agentes patogênicos e, principalmente, com a introdução das técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de hibridização de ácidos nucleicos (sondas moleculares), alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de adaptá-las ao diagnóstico da *T. equi* (FIGUEROA et al., 1993, BASHIRUDDIN et al., 1999, NICOLAIEWSKY et al., 2001). PCR é um teste molecular, que é utilizado para a detecção de genes específicos do parasita e deste modo oferece-nos uma sensibilidade maior (WISE et al, 2014), a detecção de uma parasitemia tão baixo quanto 0,000006% (NICOLAIEWSKY et al., 2001). Os resultados demonstram que a PCR é uma técnica de rápido diagnóstico e o seu procedimento é suficientemente sensível, específico e reproduzível para uso na confirmação do diagnóstico clínico da theileriose, mesmo em amostras com níveis muito baixos de parasitemia (NICOLAIEWSKY et al., 2001). A junção de testes diagnósticos eleva a sensibilidade e especificidade, e levando em consideração a capacidade de hemoparasitas diminuírem a saúde animal (CUNHA et al., 1998) e criar perdas econômicas (FRIEDHOFF, 1990), estudos de investigação são necessárias para determinar a ocorrência de doenças causadas por estes parasitas.

Dessa maneira, o objetivo do estudo foi avaliar a prevalência da *T. equi* por meio da reação de imunofluorescência indireta, assim como pela a reação em cadeia de polimerase e sua caracterização molecular utilizando o gene EMA-1, em equinos de áreas urbana e rural em seis municípios do Estado da Paraíba no nordeste do Brasil.

CAPÍTULO I- SEROLOGICAL AND MOLECULAR DETECTION OF *Theileria equi* IN  
SPORT HORSES FROM AN ENDEMIC TROPICAL AREA OF BRAZIL

**ARTIGO SUBMETIDO PARA REVISTA THE VETERINARY JOURNAL**

**Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses from an endemic  
tropical area of Brazil**

**Abstract**

Equine theileriosis is a worldwide protozoal tick-borne disease caused by *Theileria equi*, which may produce a variety of clinical signs and turn infected horses into lifetime carriers. The aim of this study was to identify putative risk factors to serological and molecular detection of *T. equi* in sports horses from one urban and five rural endemic areas of Northeastern Brazil. In overall, 71/119 (59.6%) horses have tested positive by indirect immunofluorescence assay (IFA) and 60/119 (50.4%) by polymerase chain reaction (PCR). Neither seropositivity nor molecular detection of *T. equi* ( $p > 0.05$ ) was significantly associated with the presence of ticks, horse age, gender, anemia or total plasmatic proteins. Despite all cities were less than 35 miles apart, a significant association of exposure and infection was found in Alagoa Nova ( $p = 0.02$ ) and Remígio ( $p = 0.03$ ). In conclusion, local risk factors other than presence of ticks, horse age, gender, anemia and total plasmatic proteins may dictate prevalence of *T. equi* exposure and infection in sports horses, even in highly endemic areas with no control of infection prior to horse competitions.

Keywords: Equine piroplasmosis, IFA, PCR, *Babesia equi*

## Introduction

Equine theileriosis is a worldwide tick-borne disease caused by the protozoan *Theileria equi* (formerly *Babesia equi*) which infects equids (Friedhoff et al., 1990; Vieira et al., 2013; Hussain et al., 2014; Piantedosi et al., 2014; Hawkins et al., 2015). Since severity of clinical signs may vary and horses may present lifetime infection (De Waal, 1992), the World Organization for Animal Health has established a serological testing for theileriosis to identify equine carriers (OIE, 2014).

Serological assay limitations on sensitivity and specificity have led to an increase use of molecular methods for detection of animal carriers (Nicolaiewsky et al., 2001; Alhassan et al., 2005; Bhoora et al., 2010). Additionally, molecular approaches may also improve serological testing since equi merozoite antigen 1 (EMA-1), a major surface protein and considered the most immunedominant *T. equi* antigen, has been geographically conserved among all known isolates (Kappmeyer et al., 1993).

In Brazil, despite *T. equi* has been reportedly transmitted by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Battsetseg et al., 2002), evidences suggest that infection may be also associated to *Amblyomma cajennense* (Kerber et al., 2009), an intrastadial vector of *T. equi* commonly found in Texas, USA (Scoles; Ueti, 2013). *Theileria equi* seroprevalence may vary among countries, ranging from 8.2% in Italy (Grandi et al., 19 2011), 21.6% in Israel (Steinman et al., 2012), 41.6% in Egypt (Salib et al., 2013), 50.3% in Venezuela (Mujica et al., 2011) to 78.3% in Southern (Vieira et al., 2013) and 81% in Southeastern (Santos et al., 2011) Brazil. These prevalence differences can be caused due to climate change, population studied horses, the diagnostic test used and dynamics of tick populations.



According to the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, horses should present negative results for glanders, equine infectious anemia, brucellosis and tuberculosis prior to interstate transit and sports events (Brasil, 2010). However, to the authors knowledge, no study has been conducted on *T. equi* in horses from Northeastern Brazil, a tropical climate region where equestrian sports such as “vaquejada” has been routinely practiced (Santiago et al., 2013). Thus, the present study has aimed to detect *T. equi* and to identify potential risk factors associated with the infection among horses in Northeastern Brazil.

## **Materials and Methods**

This study has been approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and Animal Welfare at the Universidade Federal da Paraíba (protocol 3305/14), Paraíba State, northeastern Brazil.

### *Study design*

A cross-sectional study approach was employed during the mild winter from July to August 2013 in five rural and one urban areas of Paraíba State, northeastern Brazil. Horses from farms located at cities of Alagoa Nova (07°02'14.7" S 035°45'61.5" W), Areia (06°58'43.2" S 035°43'23.1" W), Caturité (07°25'22.2" S 036°00'67.1" W), Lagoa Seca (07°10'51.3" S 035°49'62.1" W) and Remígio (06°59'11.0" S 35°47'69.1" W), and from urban areas of Campina Grande City (07°28'55.1" S 035°88'97.0" W), far apart no more than 35 miles to each other were used in the present study.

### *Samples*

A total of 119 blood samples were collected from clinically healthy sports (vaquejada) horses, 72 males and 47 females, of different breeds (65 mixed breed, 47 Quarter Horse, 5 Mangalarga, 1 Appaloosa and 1 Paint Horse) and ages (ranging from 2 to 13 years-old). A total of 97 horses were sampled in rural areas with 20 from Alagoa Nova, 9 from Areia, 6 from Caturité, 16 from Lagoa Seca, and 46 from Remígio (RA); and 22 horses from the urban area (UA) of Campina Grande were used. During the sampling, owners have volunteered answered an epidemiological questionnaire on horse breed, age, gender and presence of ticks. Horse ages were later stratified into two groups of  $< 5$  years and  $\geq 5$  years.

Blood samples (10 mL) were collected by venipuncture of the jugular vein using commercial sterile vacuum tubes containing serum separator gel (BD Vacutainer<sup>®</sup>, Franklin Lakes, NJ, EUA), before the realization of physical activity, and stored at room temperature (25 °C) until visible clot retraction. Samples were then centrifuged at 1500 g for 5 min, and the serum was separated and stored at -20 °C until serological analysis. Packed cell volume (PCV) and total plasmatic protein (TPP) were performed on EDTA blood samples, as previously described (Weiss et al., 2010); a PCV of 0.32 L/L or less and a TPP of 80 g/L or more were used as indicators of anemia and hyperproteinemia. Thereafter, aliquots were stored at -20 °C until molecular testing.

### *Source of Theileria equi*

A *T. equi* strain previously isolated from a horse at the Veterinary Teaching Hospital, Universidade Estadual de Londrina, Paraná State, southern Brazil, has been used as a basis for indirect immunofluorescent antibody assay (IFA) and positive controls. The isolate was cryopreserved kept in liquid nitrogen as blood stability containing 10% dimethyl sulfoxide. The *T. equi* soluble antigen for IFA was prepared by the inoculation of the strain intravenously in a splenectomized foal free from hemoparasites, as previously described (Madruga et al., 1986). Briefly, the blood with 10% *T. equi* parasitemia was collected and washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2), by centrifugation at 1000 g for 15 min. After each centrifugation step, the buffy coat was removed. Then, thin blood smears were prepared and stored at -80 °C. At the moment of analyses, smears were dried for 10 min at 37 °C and circles were drawn with finger nail polish.

#### *Detection of anti-Theileria equi antibodies*

Anti-*T. equi* antibodies in serum samples were evaluated by IFA in 119 samples. An amount of 10 µL of serum, diluted 1:80 in PBS, was added to each circle on the slide and incubated for at 37 °C for 30 min, washed three times for 5 min in PBS (pH 7.2), additionally washed by distilled water, then dried at room temperature. Twenty microliters of fluorescein isothiocyanate-conjugated rabbit anti-horse IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 1:160 dilution in PBS with 1% of bovine serum albumin and 1% Evans blue were applied onto the slide. Slides were then incubated at 37 °C for 30 min, washed three times for 5 min, additionally washed by distilled water, allowed to air dry and subsequently examined using a microscope with a fluorescent light source. Samples were considered positive when reacting

with dilution  $\geq 1:80$  (Baldani et al., 2010). Titers were determined to the largest dilution in which fluorescence was visualized around the parasite (endpoint titers).

#### *DNA extraction*

DNA was extracted from all blood samples using a commercially available kit (Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Negative control purifications using ultra-pure water were performed in parallel to monitor cross-contamination with each batch of 30 samples.

#### *PCR assays*

A PCR for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was performed to ensure successful DNA extraction, as previously described (Birkenheuer et al., 2003). Samples were tested by a conventional PCR for the detection of EMA-1 gene of *T. equi* using a set of previously described primers (5'-GCA-TCC-ATT-GCC-ATT-TCG-A-3'; 5'-GTA-AAA-TAG-AGT-AGA-AAA-TGC-AAT-GGC-3') (Kumar et al., 2004). Briefly, 3  $\mu$ L of DNA was used as a template for the amplification, in a total reaction mixture of 25  $\mu$ L containing 10x PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.5 mM of deoxynucleoside triphosphate (dNTP's), 0.25 U of *Taq*DNA polymerase (Platinum<sup>®</sup>, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 0.1 mM of each primer. After initial denaturation at 94 °C for 2 min, the amplification consisted of 40 cycles of 30 sec each at temperatures of 94 °C, 58 °C and 72 °C for denaturation, annealing and extension, respectively, with a final extension at 72 °C for 30 sec; the samples were kept at 4 °C until analyzed.

### *Sequencing*

A fragment (700 bp) of the EMA-1 gene from six *T. equi* isolates (10% of positive samples) was sequenced. The EMA-1 gene of *T. equi* isolates were amplified using a set of previously described primers (Kumar et al., 2004). The amplified PCR products were subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose gels for one hour at 100V, followed by SYBR safe staining (6 µg/mL), and were viewed under a 312 nm UV light transilluminator. The gels were subsequently photographed using Kodak DC290 (Nova York, EUA). PCR products were purified from the agarose gel (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen), and directly pair-ended sequenced by Sanger method using the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Thereafter, 124 sequences were subjected to BLASTn analysis (Altschul et al., 1990) for determining the identity with the sequences deposited in the nucleotide database.

### *Statistical Analysis*

The Chi-square or Fisher's exact test was used to determine the difference between whether individual factors were associated with infection or seropositivity to *T. equi*. Odds ratio (OR), 95% confidence interval and *p* values were calculated separately for each variable. Results were considered significantly different when  $p < 0.05$ . Data were compiled and analyzed in Epi Info™ software (version 7.1.5, CDC).

## **Results**

### *T. equi* occurrence

The seroprevalence of *T. equi* by IFA and PCR within each variable evaluated were summarized in table 1. A total of 71/119 (59.6%; 95% CI: 50.7-68.0%) horses were seropositive for *T. equi*. Antibodies titers ranged from 80 to 320 in horses from RA and UA. Fifty-six of 119 (47.0%; 95% CI: 38.3-56.0%) horses showed the presence of ticks. All horse samples amplified the GAPDH gene. Sixty out of 119 (50.4%; 95% CI: 41.5-59.2%) horses were positive for *T. equi* by PCR.

#### *PCV and TPP*

The median PCV concentration for horses was 0.32 L/L. Seventy-six/119 (63.9%; 95% CI: 54.5-72.5%) horses were anemic. There was no difference ( $p = 0.7794$ ) on median PCV between positive (0.30 L/L) and *T. equi*-PCR negative horses (0.33 L/L). In anemic horses, 41/76 (53.95%) tested positive by PCR.

The median TPP concentration for horses was 80.5 g/L. Ninety-seven of 119 (82.9%; 95% CI: 74.8-89.2%) horses were hyperproteinemic and 6/119 (5.1%; 95% CI: 1.9-10.8%) hypoproteinemic. There was no difference ( $p = 0.2846$ ) on median TPP between positive (89 g/L) and *T. equi*-PCR negative horses (86.5 g/L). In hyperproteinemic horses, 48/97 (49.48%) tested positive by PCR.

#### *Risk factors for T. equi*

No significant association was found between age ( $p = 0.6583$ ), gender ( $p = 0.2448$ ) or presence of ticks ( $p = 0.8257$ ), and seropositivity to *T. equi* (Table 1). However, horses sampled in Alagoa Nova were 4.33 times (95% CI: 1.15-16.25;  $p = 0.0257$ ) more likely to be seroreactive for *T. equi* than those sampled in Campina Grande City.

### *Sequencing*

Sequences of EMA-1 gene of all six *T. equi* isolates analyzed showed  $\geq 99\%$  identity with *T. equi* EMA-1 gene sequences from Japan (AB015217), United States (L13784), Russia (AB015211), Brazil (U97167), and others by BLAST analysis.

### **Discussion**

To the author's knowledge, this is the first serological and molecular detection of *T. equi* and their potential association with epidemiological data in horses from Brazil. Horses evaluated in this study were naturally and continuously exposed to ticks and submitted to monthly transportation across Northeastern Brazil to participate in "vaquejada" sports events, which may have increased the parasite spreading.

In this study, 59.6% of the horses were seroreactive for *T. equi* within previous serosurveys in Brazilian horses, which have shown prevalences ranging from 21.6% to 81% (Heuchert et al., 1999; Xuan et al., 2001; Kerber et al., 2009; Vieira et al., 2013). Using PCR as the diagnostic method, 50.4% of the horses were positive for *T. equi*. Sequencing results confirmed the presence of *T. equi* infection in the sampled horses. Combining IFA and PCR has increased the prevalence of *T. equi* to 77.3%.

Studies of the prevalence of *T. equi* in horses of various uses in other countries, using the IFAT and PCR, respectively obtained prevalences of 32% and 49% in Hungary (Farkas et al., 2013); 48% and 45% in Iran (Abedi et al., 2013). Epidemiological studies in the Southeast region of Brazil, Minas Gerais, showed higher values for the seroprevalence (91%) and

molecular analysis of prevalence (59.7%) of equine theileriosis (Heim et al., 2007). The different prevalence of theileriosis in horses between different countries, may be explained with differences in the sensitivity and specificity of diagnostic tests used, different climatic variations and the occurrence and abundance of the vectors.

Anemia due to hemolysis is a common finding on acute and chronic *T. equi* infected horses (Wise et al., 2014). In the present study, 53.95% of anemic horses tested positive for this parasite by PCR. Although previous studies have shown an association in horses (Wise et al., 2014) and donkeys (Laus et al., 2015), no association ( $p = 0.7794$ ) was found between *T. equi* infection and anemia in the present study. In addition, despite 82.9% horses were hyperproteinemic, no association ( $p = 0.2846$ ) with *T. equi* infection was found among the sampled horses. Hyperproteinemia in babesiosis has been usually associated to dehydration (Divers, 1998) or increase in  $\gamma$ -globulin concentration (Radostits et al 1999). Since no parasite load or time of infection were determined, the cause of hyperproteinemia could not be established in the present study.

Alagoa Nova and Remígio horses were more likely of exposure and infection by *T. equi* than horses from Campina Grande City, respectively. Although no association was found ( $p = 0.05$ ) between the presence of ticks, gender, age and *T. equi* seropositivity or infection, all horses from Remígio County were infested by ticks. The absence of association between the presence of ticks and *T. equi* seropositivity or infection may have occurred due to winter sampling, with horses mostly parasitized by larvae and nymphs, as previously described (Vieira et al., 2013).

## **Conclusion**



A high seroprevalence to *T. equi* was found in ‘vaquejada’ horses from Paraíba State, northeastern Brazil. Active surveillance programs for this blood parasite in horses prior to sport events are crucial to monitoring control measures, particularly because this horse population may act as disseminators of this piroplasm. Local risk factors other than presence of ticks, horse age, gender, anemia and total plasmatic proteins may dictate prevalence of *T. equi* exposure and infection in sports horses, even in highly endemic areas with no control of infection prior to horse competitions.

#### **Conflict of interest statement**

All the authors have declared that there are no conflicts of interest.

#### **Acknowledgments**

This study is part of the Master degree of Luana P.S. Ribeiro at the Universidade Federal da Paraíba.

#### **References**

Abedi, V., Razmi, G., Seifi, H., Naghibi, A., 2014. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses and ixodid ticks in Iran. Ticks and tick-borne diseases 5, 239–44.

Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N., Igarashi, I. 2005. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. Veterinary parasitology 129, 43–9.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 403–410.

Amir, S., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G. 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel short communication. Veterinary Parasitology 187, 558-562.

Baldani, C.D., Nakaghi, A.C., Machado R.Z. 2010. Occurrence of *Theileria equi* in horses raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 19, 228-232.

Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F.G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K., 2002. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. 107, 351–357.

Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweygarth, E., Jongejan, F., Collins, N.E., 2010. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Veterinary Parasitology* 168, 201–211.

Brasil, 2010. Manual de preenchimento para emissão de guia de trânsito animal de equídeos. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Brasília, pp. 25.

Bruning, A., 1996. Review e q u i n e piroplasmosis an update o n diagnosis , treatment and prevention. *British Veterinary Journal* 152, 139-151.

Cunha, C.W., Silva, S.S., Osório, B.L., Dutra, C.L. 1998. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. *Ciência Rural* 2, 283-286.

De Waal, D.T., 1992. Equine piroplasmosis: a review. *Brit. Vet. J.* 148, 6–14.

Dias, A.F.L. 2008. Alterações hematológicas encontradas em equinos com *Theileria equi* (*T. equi*) e *Babesia caballi* (*B. caballi*) em Sorocaba, São Paulo. Monografia (Especialização) apresentada na Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ. 27p.

Divers, T.J., 1998. Liver failure: hemolytic anemia. In: Orsini, JA and Diveras, TJ (Eds.), Manual of equine emergencies. 4th Edn, Philadelphia, W. B. Saunders Co., p. 273-296.

Farkas, R., Tánczos, B., Gyurkovszky, M., Földvári, G., Solymosi, N., Edelhofer R., Hornok, S. 2013. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. Veterinary Parasitology 3, 143-148.

Friedhoff, K.T., Soulé, C., 1996. An account on equine babesioses. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 15, 1191–1201.

Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., Müller, I., 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. Rev. Sci. Tech. 9, 1187–1194.

Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sassera, D., Kramer, L.H. 2011. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* Infection in Horses from Northern Italy. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11, 955–956.

Hammad, M., Saqib, M., Raza, F., Muhammad, G., Nadeem, M., Khalid, M., Saleem, M., Jabbar, A. 2014. Veterinary Parasitology Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria*

*equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. Veterinary Parasitology 202, 248–256.

Hawkins, E., Kock, R., McKeever, D., Gakuya, F., Musyoki, C., Chege, S.M., Mutinda, M., Kariuki, E., Davidson, Z., Low, B., Skilton, R. a, Njahira, M.N., Wamalwa, M., Maina, E. 2015. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* as well as the identification of associated ticks in sympatric Grevy's zebras (*Equus grevyi*) and donkeys (*Equus africanus asinus*) in northern Kenya. Journal of wildlife diseases 51, 137–47.

Heim, A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Costa-Junior, L.M., Bastos, C.V., Cabral, D.D., Hirzmann, J., Pfister, K. 2007. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. Parasitology Research 102, 63-68.

Heuchert, C.M., De Giulli Jr, V., De Athaide, D.F., Böse, R., Friedhoff, K.T., 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. Veterinary Parasitology 85, 1-11.

Hussain, M.H., Saqib, M., Raza, F., Muhammad, G., Asi, M.N., Mansoor, M.K., Saleem, M., Jabbar, A., 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. Veterinary Parasitology 202, 248-56.

Kappmeyer, L.S., Thiagarajan, M., Herndon, D.R., Ramsay, J.D., Caler, E., Djikeng, A., Gillespie, J.J., Lau, A.O., Roalson, E.H., Silva, J.C., Silva, M.G., Suarez, C.E., Ueti, M.W., Nene, V.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P., Brayton, K.A. 2012. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. BMC Genomics 13, 603.

Karatepe, B., Karatepe, M., Cakmak, A., Karaer, Z., Ergün, G. 2009. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. Trop Anim Health Prod 41, 109-113.

Kerber, C.E., Labruna, M.B., Ferreira, F., De Wall, D.T., Knowles D.P., Gennari, S.M. 2009. Prevalence of equine piroplasmosis and its association with tick infestation in the state of São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 18, 1–8.

Kouam, M.K., Kantzoura, V., Gajadhar, A.A., Theis, J.H., Papadopoulos E., Theodoropoulos, G. 2010. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. Veterinary Parasitology 169, 273-278.

Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J.Y., Huang, X., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi I., Sugimoto, C. 2004. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. Mol Biochem Parasitol 2, 221-7.

Laus F., Spaterna, A., Faillace, V., Veronesi, F., Ravagnan, S., Beribé, F., Cerquetella, M., Meligrana, M., Tesei, B. 2015. Clinical investigation on *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Veterinary Research* 11, 100.

Leal, D.C. 2010. **Avaliação da PCR, PCR multiplex e nested PCR no diagnóstico de *Theileria equi* em equinos.** Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, BA. 70p.

Madruga, C. R., Kessler, R. H., Sacco, A. M. S., Jesus, E. F., Miguita, C. T. Produção de antígenos e análise preliminar do teste de Imunofluorescência Indireta para diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1986. 4 p. Circular Técnico n. 31.

Madruga, C.R., Araújo, F.R., Soares, C.O. 2011. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Campo Grande, MS, p.360.

Maggi, R.G., Birkenheuer, A.J., Hegarty, B.C., Bradley, J.M., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2014. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & Vectors* 7, 127.

Meyer, D.J., Coles, E.H., Rich, L.J. 1995. Medicina De Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico. Roca, São Paulo, p. 308.

Mujica, F.F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R.D., Barrios, N., Álvarez, R. Granda, F. 2011. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. Veterinary Parasitology 1–2, 180–183.

Nicolaiewsky, T.B., Richter, M.F., Lunge, V.R., Cunha, C.W., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A.S., da Silva, S.S., Ozaki, L.S., 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. Vet. Parasit. 101, 9–21.

Nizoli, L.Q., Gotze, M.M., Félix, S.R., Silva, S.S., Nogueira, C.E.W. 2008. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State , Brazil. Parasitol Latinoam 63, 46–50.

OIE, 2014. Equine piroplasmosis. In: Terrestrial Animal Health Code, Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2010/en\\_chapitre\\_equine\\_piroplasmosis.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_equine_piroplasmosis.htm) (accessed 21.04.15).

Peckle, M., Pires, M.S., Dos Santos, T.M., Roier, E.C.R., Da Silva, C.B., Vilela, J. a R., Santos, H. a., Massard, C.L., 2013. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and



their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Research* 112, 2017–2025.

Pereira-Junior, L.R., Gama, J.S.N., Resende, I.R.A., Campos, V.B., Prazeres, S.S. 2008. Variação climática no brejo paraibano e sua influência na produtividade da cana-de- açúcar. Mossoró, Rio Grande Do Norte, Brasil. *Revista Verde*, 3, 50-58.

Phipps, L.P. Other, A. 2004. Transplacental transmissions of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 17, 406-408.

Piantedosi, D., D'Alessio, N., Di Loria, a, Di Prisco, F., Mariani, U., Neola, B., Santoro, M., Montagnaro, S., Capelli, G., Veneziano, V., 2014. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. *Veterinary Journal* (London, England : 1997) 202, 578–82.

Rüegg, S.R., Torgerson, P., Deplazes, P., Mathis, A. 2007. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology* 134, 939-943.

Salib, F.A., Youssef, R.R., Rizk, L.G., Said, S.F. 2013. Epidemiology, diagnosis and therapy of *Theileria equi* infection in Giza, Egypt. *Vet World* 2, 76-82.

Santiago, T.A., Emília, H., Cordeiro, C. 2014. Blood biomarkers of the horse after field Vaquejada test. *Comparative Clinical Pathology*, 23(3), p. 769-774, 2014.

Santos, T.M., Roier, E.C.R., Santos, H.A., Pires, M.S., Vilela, J.A.R., Moraes, L.M.B., Almeida, F.Q., Baldani, C.D., Machado, R.Z., Massard, C.L. 2011. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio De Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 3, 235–241.

Scoles, G. a, Ueti, M.W. 2013. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. *Parasites & vectors* 6, 306.

Sevnic, F., Maden, M., Kumas, C., Sevnic, M., Ekici, O.C. 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Veterinary Parasitology* 156, 173-177.

Shkap, V., Cohen I., Leibovitz, B., Savitsky, P.E., Avni, G., Shofer, S., Giger, U., Kappmeyer L., Knowles, D. 1998. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Veterinary Parasitology* 76, 251-259.

Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G. 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology* 187, 558–562.

Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 1 Ed. São Paulo: Roca, 2007.

Vieira, T.S.W.J., Vieira, R.F.C., Finger, M. a P., Nascimento, D. a G., Sicupira, P.M.L., Dutra, L.H., Deconto, I., Barros-Filho, I.R., Dornbusch, P.T., Biondo, A.W., Vidotto, O. 2013. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. Ticks and tick-borne diseases 4, 537–41.

Xuan, X., Zhang, S., Huang, X., Bayin, C., Xuan, X., Igarashi, I., Fujisaki, K., Kabeya, H., Maruyama, S., Mikami, T., 2001. Detection of antibodies to *Babesia equi* in horses by a latex agglutination test using recombinant EMA-1. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8, 645-646.

Weiss, D. J., Wardrop, K.J., Schalm, O.W. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. /Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, p.821-828.

Wise, L.N., Pelzel-McCluskey, A.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P., 2014. Equine piroplasmosis. The Veterinary clinics of North America. Equine practice 30, 677–93.

Table 1. Serological and molecular prevalence of *Theileria equi* in horses in different parts of Paraíba State, northeastern Brazil

Part	<i>T. equi</i> (IFA)					<i>T. equi</i> (PCR)				
	+/n	(%)	OR	95% CI	p-value	+/n	(%)	OR	95% CI	p-value
<b>Place</b>										
Alagoa Nova	15/20	75.0	4.33	1.15-16.25	0.0257	14/20	70	1.50	0.48-4.63	0.4798
Areia	4/9	44.4	1.15	0.24-5.53	1.0000	5/9	55.6	2.68	0.54-13.15	0.2180
Remígio	30/46	65.2	2.71	0.95-7.69	0.0579	27/46	58.7	3.04	1.04-8.89	0.0381
Caturité	3/6	50	1.44	0.23-8.84	0.6899	2/6	33.3	1.07	0.16-7.27	1.0000
Lagoa Seca	10/16	62.5	2.40	0.64-9.02	0.1887	5/16	31.3	0.97	0.24-3.89	1.0000
Campina Grande	9/22	40.9				7/22	31.8			
<b>Presence of ticks</b>										
Yes	34/56	60.7	1.08	0.52-2.26	0.8257	29/56	51.8	1.11	0.54-2.28	0.7787
No	37/63	58.7				31/63	49.2			
<b>Age</b>										
≥5	31/50	62.0	1.18	0.56-2.49	0.6583	29/50	58	1.69	0.81-3.53	0.1592
<5	40/69	58.0				31/69	44.9			
<b>Gender</b>										
Male	46/72	63.9	1.55	0.73-3.28	0.2448	39/72	54.2	1.46	0.69-3.06	0.3116
Female	25/47	53.2				21/47	44.7			

+, Number of positive animals; N, number of samples per variable; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo possibilitou a investigação da prevalência e fatores de riscos da doença causada pelo parasita *Theileria equi* em populações de equinos na região do brejo paraibano no Estado da Paraíba, através da realização de exames simples como avaliação do hematócrito e proteínas plasmáticas totais, como também de análises mais complexas e específicas, como o teste de PCR para identificação de hemoplasmas. E o resultado demonstrou a prevalência da infecção parasitária por *T. equi* nos equinos das cidades avaliadas. Todos os animais soropositivos foram assintomáticos, atuando como portadores crônicos e possíveis disseminadores do parasito. Considerando a prevalência encontrada no estudo, ressalta-se a necessidade de elaboração de programas de vigilância ativa, bem como o monitoramento do estado clínico dos animais dessa espécie, a fim de desenvolver medidas de controle mais eficazes para o combate do vetor, os carrapatos, com o intuito de minimizar a propagação do piroplasma para os animais suscetíveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHIRUDDIN JB, CAMMA C, REBELO E. Molecular detection of Babesia equi and Babesia 298 caballi in horse blood by PCR amplification of parts of the 16S rRNA gene. **Vet Parasitol.**, v. 84, p.75-83, 1999.

BUTLER, C.M.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.; STOUT, T.A. et al. Prevalence of the causative agents of equine piroplasmosis in the South West of The Netherlands and the identification of two autochthonous clinical Theileria equi infections. **Veterinary journal**, v.193, n. 2, p.5-381, 2012.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S. et al. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v.40, n. 2, p. 1-1-18, 2009.

CUNHA, C.W. MCGUIRE, T.C.; KAPPMAYER, S. L. et al. Development of specific immunoglobulin G<sub>a</sub> (IgG<sub>a</sub>) and IgG<sub>b</sub> antibodies correlates with control of parasitemia in Babesia equi infection. **Clinical Vaccine Immunology.**, v.13, n.2, p.297–300, 2006.

CUNHA, C.W., SILVA, S.S., OSÓRIO, B.L., DUTRA, C.L. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. **Ciência Rural**, v. 2, p. 283-286, 1988.

DE WAAL, D.T. Equine piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 6-14, 1992.

DE WAAL, D.T., VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmosis. In: COETZER, J.A., TUSTIN, R.C. (ed.). **Infectious Diseases of Livestock** (2<sup>o</sup>ed.). USA: Oxford University Press. 2004. Cap. 5, p.425-432.

FIGUEROA, J.V., CHIEVES, L.P., JOHNSON, G.S., BUENING, G.M., Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.** v. 50, p. 69–81, 1993.

FREIDHOFF, K.T.; TENTER, A.M.; MULLER, E.U. Hemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Revue scientifique et technique**, v.9, n.4, p.1187-1194, 1990.

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 23-52.

GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNÁNDEZ, E. et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. **The Veterinary Journal**, v.195, n. 2, p. 172-8, 2013.

GAUNT, D. S. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (eds.). **Schalm's veterinary hematology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania. 2000. p. 154–162.

HENRY, M. M. Hemolytic Anemia. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: Saunders. 1993. chap. 11, p.495-501.

JACK, R.M.; WARD, P.A. Mechanisms of entry of *Plasmodium* and *Babesia* into red cells. In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. (Eds). **Babesiosis**. New York: Academic Press. 1981, p. 445-458.

KNOWLES JR., D.P.; KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN, L.E. Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a

Family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 90, n.1, p. 69-79, 1997.

KOUAM, M.K.; KANTZOURA, V.; GAJADHAR, A.A. et al. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.1-3, p. 273–278, 2010.

KUMAR, S. YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y. et al. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.133, n.2, p.221-7, 2004.

NICOLAIEWSKY, T.B.; RICHTER, M.F.; LUNGE, V.R. et al. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.9–21, 2001.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Terrestrial Manual 2014: Equine Piroplasmosis**. 2014. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.08\\_EQUIN\\_E\\_PIROPLASMOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUIN_E_PIROPLASMOSIS.pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2015.

PROCHNO, H.C.; SCORSIN, L.M.; DE MELO, F.R. et al. Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.1, p. 85–89, 2014.

RIBEIRO, I.B.; CÂMARA, A.C.; BITTENCOURT, M.V. et al. Detection of *Theileria equi* in spleen and blood of asymptomatic piroplasm carrier horses. **Acta Parasitologica**, v.58, n.2, p.218–22, 2013.

ROTHSCHILD, C.M.; DONALD, P.K. Equine piroplasmosis. In: SELTON; LONG. **Equine Infectious Diseases**. Cap.60, p. 465-473, 2007.



SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H.A. et al. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio De Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.3, p.235–241, 2011.

SIGG, L.; GERBER, V.; GOTTSTEIN, B. et al. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. **Parasitology International**, v.59, n.3, p. 313–317, 2010.

TENTER, A. M., FRIEDHOFF, K. T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Veterinary Parasitology*, v. 20, p. 49-61, 1986.

THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos cavalos**. 4. ed., São Paulo: Varela, 2005.

VIEIRA, T.S.W.J.; VIEIRA, R.F.C.; FINGER, M. A.P. et al. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná state, Southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 6, p. 537–541, 2013.

WISE, L.N.; PELZEL-MCCLUSKEY, A.M.; MEALEY, R.H. et al. Equine piroplasmiasis. **Veterinary Clinics of North American Equine Practice**, v. 30, n.3, p.677–93, 2014.

## **APÊNDICE I**

### **QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

**LABORATÓRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA - UFPB**

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO - EQUINOS**

Cidade: _____	Propriedade nº: _____
Data: ____ / ____ / ____	
Nome da propriedade: _____	
Proprietário: _____	Fone: _____
Nº do GPS: _____	

<b>DADOS DO ANIMAL</b>	
Nº: _____	1) Nome: _____
2) Idade: _____	3) Sexo: ( ) M ( ) F
4) Raça: _____	5) Finalidade: _____

<b>CONTROLE DE CARRAPATOS</b>	
6) Visita área de mata: ( ) Sim ( ) Não	
7) Presença de carrapatos: ( ) Sim ( ) Não	
8) Controle de carrapatos: ( ) Sim ( ) Não Qual o produto? _____	
9) Frequência controle carrapatos: ( ) Mensal ( ) Trimestral ( ) Semestral ( ) Anual	

<b>SANEAMENTO</b>	
10) Qual a origem da água de consumo dos animais? ( ) Rede pública ( ) Poço ( ) Rio/córrego ( ) Cisterna	
11) Qual o destino do esgoto? ( ) Rede pública ( ) Fossa ( ) Céu aberto	
12) Qual o destino do lixo da sua casa? ( ) Coleta pública ( ) Quintal ( ) Queima	
13) Destino dos excrementos dos animais: ( ) Amontoado ( ) Enterrado ( ) Esterqueira ( ) Adubo animal ( ) Outros: _____	
14) Distância entre fossa ou depósito de fezes e fonte de água: ( ) 25m ( ) > que 25m ( ) < que 25m ( ) outro: _____	